烟夜蛾性信息素结合蛋白2(PBP2)基因的克隆、序列分析与时空表达

李 亮，杨文玲，郭线茹*，罗梅浩，原国辉，乔 奇，付晓伟
(河南农业大学植物保护学院，郑州 450002)

摘要： 性信息素结合蛋白(pheromone binding proteins, PBPs)在昆虫雌雄间信息交流中起着重要作用。本研究利用 RT-PCR 和 RACE 方法，从烟夜蛾 *Helicoverpa assulta* (Guenée)雄虫触角中克隆了性信息素结合蛋白2基因的开放阅读框及3′末端序列，该基因被命名为 *HassPBP2*(GenBank 登录号为 EU316186)。克隆和测序结果表明，*HassPBP2* 开放阅读框全长 450 bp，编码 149 个氨基酸残基，推测编码蛋白的分子量为 16.9 kD，等电点为 5.56。*HassPBP2* 基因结构分析表明，该基因由 3 个外显子和 2 个内含子组成，内含子的长度分别为 90 和 261 bp。氨基酸序列联配分析表明，此序列具有气味结合蛋白的典型特征，与其他鳞翅目昆虫 PBPs 的一致性在 34% ~91% 之间，其中与棉铃虫 *Helicoverpa armigera* PBP2 和烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* PBP2 的序列一致性高达 91%。时间表达和组织表达分析显示，*HassPBP2* 在卵期、幼虫期和蛹早期不表达，在蛹中期开始表达，并一直持续到成虫中期，且只在雌、雄成虫触角中表达。

关键词： 烟夜蛾；性信息素结合蛋白；基因克隆；序列分析；时空表达
中图分类号： Q966 **文献标识码：** A **文章编号：** 0454-6296(2009)11-1199-07

Cloning, sequence analysis and spatio-temporal expression of a pheromone binding protein 2 (PBP2) gene from *Helicoverpa assulta* (Guenée) (Lepidoptera: Noctuidae)

LI Liang, YANG Wen-Ling, GUO Xian-Ru*, LUO Mei-Hao, YUAN Guo-Hui, QIAO Qi, FU Xiao-Wei
(College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Pheromone binding proteins (PBPs) play an important role in communication between male and female insects. The open reading frame and 3′ end full-length cDNA of a novel pheromone binding protein 2 gene was cloned from *Helicoverpa assulta* (Guenée) by using RT-PCR and RACE methods, which was named *HassPBP2* (GenBank accession no. EU316186). The cloning and sequencing results showed that the full-length of open reading frame in *HassPBP2* was 450 bp, encoding 149 amino acid residues with the predicted molecular weight and isoelectric point of 16.9 kD and 5.56, respectively. Gene structure analysis revealed that *HassPBP2* consists of 3 exons and 2 introns with length of 90 and 261 bp, respectively. Amino acid sequence analysis showed that the deduced amino acid sequence of *HassPBP2* had the characteristics of odorant binding proteins. *HassPBP2* had 34%-91% identity with PBPs of other Lepidoptera moths, and shared 91% identity with the PBP2 sequences from *H. armigera* and *Heliothis virescens*. Temporal expression revealed that *HassPBP2* transcript was observed clearly from mid-stage pupa to mid-stage adult, but not in the egg, larva and early-stage pupa. The tissue analysis further indicated that *HassPBP2* was only expressed in the antennae of both male and female adults.

Key words: *Helicoverpa assulta*; pheromone binding protein; gene cloning; sequence analysis; spatio-temporal expression

昆虫的嗅觉系统在其觅食、求偶、寻找产卵场所等一系列生命活动中起着重要作用。存在于嗅觉感器腔内的气味结合蛋白(odorant binding proteins, OBPs)能识别并携带进入感器腔的气味分子到达嗅

基金项目：河南省杰出青年科学基金项目(074100510013)
作者简介：李亮，男，1983 年生，河南平顶山人，硕士研究生，主要从事昆虫生态与分子生物学研究，E-mail: liliangd2008@tom.com
*通讯作者 Author for correspondence, E-mail: xrguod@sina.com
收稿日期 Received: 2009-08-12；接受日期 Accepted: 2009-09-24

觉神经元树突膜上的气味受体，因此，OBPs 在昆虫与外界的化学信息交流方面至关重要（王桂荣等，2002；Larsson *et al*., 2004）。

根据 OBPs 结合的配基、同源性及其所在的感受器类型，可把昆虫气味结合蛋白（OBPs）分为性信息素结合蛋白（pheromone binding proteins，PBPs）、普通气味结合蛋白（general odorant binding proteins，GOBPs）和触角结合蛋白（antennal-binding proteins，ABPs）（Vogt *et al*., 1989，1991，1999）等。PBPs 能选择性识别结构非常相似的性信息素成分（Hansson，1995），因而在昆虫雌雄间信息交流和种间隔离中起着重要作用。研究发现，在同一物种中存在多种性信息素结合蛋白（PBPs），它们被不同的基因座（loci）编码（Bette *et al*., 2002；Picimbon and Gadenne，2002），目前已经在多种昆虫中克隆得到了 PBPs 的基因，这些基因包括 PBP1 基因、PBP2 基因和 PBP3 基因（Picimbon and Gadenne，2002；Abraham *et al*., 2005；de Santis *et al*., 2006；Forstner *et al*., 2006；Xiu and Dong，2007；Xiu *et al*., 2008），其编码的氨基酸序列同源性在 32% ～92% 之间（Abraham *et al*., 2005）。如在烟草天蛾 *Manduca sexta*、柞蚕 *Antheraea pernyi*、多音大蚕蛾 *Antheraea polyphemus*（Maida *et al*., 2000）、家蚕 *Bombyx mori* 和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 触角中均存在 3 种不同类型的信息素结合蛋白，而在甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae*（Maïbèche-Coisné *et al*., 1998）、烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*（Krieger *et al*., 1993）、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*（Xiu and Dong，2007）、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*（Xiu *et al*., 2008）等昆虫的触角中也都发现了 2 种 PBPs。标记性信息素的结合试验证明，舞毒蛾 *Lymantria dispar* 与甘蓝夜蛾的 PBPs 只结合信息素混合物中的一种组分（Vogt *et al*., 1989；Nagnan-Le Meillour *et al*., 1996），而家蚕的 PBP1 和 PBP2 能够结合相同的性信息素组分（Zhou *et al*., 2009）。可见，不仅信息素结合蛋白存在多样性，而且信息素结合蛋白的识别选择性在不同昆虫中也存在差异。

烟夜蛾 *Helicoverpa assulta*（Guenée）是烟草、辣椒等经济作物的主要害虫，目前已在烟夜蛾触角中发现了 PBP1（吴少英等，2005）和 PBP3（刘晓光等，2006）的基因。本研究利用 RT-PCR 和 RACE 方法，从烟夜蛾雄虫触角中克隆获得了一个 PBP2 基因，并从烟夜蛾基因组 DNA 中克隆得到了该基因序列，在此基础上，利用跨内含子引物和半定量 RT-PCR 技术对其在不同组织和发育时期的表达情况进行了研究，期望为分析和探明烟夜蛾雌雄间的信息交流机制及夜蛾类昆虫的进化关系提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫：烟夜蛾为河南农业大学实验室饲养，温度为 26℃，光周期 16L:8D，蛹期分雌雄分别饲养。取不同组织和发育时期的材料，立即放入液氮中快速冷冻，然后置于 −80℃保存备用。

1.1.2 主要试剂：总 RNA 抽提试剂（RNAiso Reagent）、3′-Full RACE 试剂盒、Taq DNA 聚合酶、DL2000 Marker、pMD19-T 载体、基因组 DNA 提取试剂盒（Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver. 3.0）购自 TaKaRa 公司；反转录试剂盒（RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit）为 MBI 公司产品；DNA 凝胶回收试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 和基因组 DNA 的提取：按照试剂使用说明，利用 RNAiso Reagent 提取烟夜蛾不同组织和发育时期的总 RNA，利用基因组 DNA 提取试剂盒提取烟夜蛾触角中的基因组 DNA。

1.2.2 引物的设计与合成：根据棉铃虫 PBP2 基因、烟芽夜蛾 PBP2 基因和甜菜夜蛾 PBP2 基因（GenBank 登录号分别为 EU647241，AM403491 和 AY545636）核苷酸序列设计合成 PP1 和 PP2 引物。本研究所用引物及其用途见表 1，引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2.3 RT-PCR：首先按照反转录试剂盒说明，以雄虫触角总 RNA 为模板合成 cDNA 第一链，然后以合成的 cDNA 第一链为模板，利用 PP1 和 PP2 引物进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为：94℃ 3 min；94℃ 1 min，59℃ 1 min，72℃ 1 min，35 个循环；72℃ 10 min。

1.2.4 基因克隆和序列测定：利用 1% 琼脂糖凝胶电泳对上述 PCR 产物进行分析，并纯化目的片段，基因克隆参照 Sambrook 等（2002）的方法进行。序列测定由大连宝生物工程有限公司完成。

表 1　本实验设计合成的引物及其用途

Table 1 Primers and their usage in the experiment

引物名称 Name	引物序列 Primer sequence	扩增片段 Amplified fragment
PP1	5′-ATGATGGGCTCAGCGATGTC-3′	
PP2	5′-CACCC(A/G)GC(C/T)ATAGGTCATGT-3′	*HassPBP2* cDNA
P3P1	5′-ACCACTGCAGCCGGGTCCTGGAGATAG-3′	
P3P2	5′-CCTATAGTGAAATCACTAGTGGAGGATCCGCG-3′	*HassPBP2* cDNA 3′ end
POP1	5′-ATGATGGGCTCAGCGATGTCCTC-3′	
POP2	5′-CCTATTTTCATCTCCTTCTCCATCT-3′	*HassPBP2* cDNA ORF
PSP1	5′-AACTGCTTACAAAGATGAGTGAGG-3′	
PSP2	5′-GCTATCTCCAGGACCCGGCTGC-3′	*HassPBP2* 基因片断 *HassPBP2* gene fragment
NCP1	5′-CCGCTGAAACTCCTTCGTGC-3′	
NCP2	5′-TGTCGGTCCGAAGACCTCAC-3′	*Hass18SrRNA* 基因片断 *Hass18SrRNA* gene fragment

1.2.5　3′RACE：根据上述获得的基因序列，设计合成 P3P1 引物，并与 3′RACE 试剂盒中的 3′RACE Outer Primer 配对进行 Outer PCR 反应，然后利用设计合成的 P3P2 引物和试剂盒中的 3′RACE Inner Primer 引物进行套式 PCR 扩增，反应条件按照试剂盒使用说明书进行，3′RACE 产物的电泳分析、基因克隆和序列测定方法同 1.2.4。

1.2.6　烟夜蛾 PBP2 基因完整 ORF 扩增及内含子的获得：根据烟夜蛾 PBP2 基因部分 cDNA 片段序列和 3′RACE 产物测序结果，设计 POP1 和 POP2 基因特异性引物，分别以烟夜蛾雄虫触角 cDNA 和基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增，以获得完整 ORF 序列，并对该基因的内含子进行分析。以上实验均重复 2 次。

1.2.7　烟夜蛾 PBP2 基因时空表达分析：分别取 2 μg 不同组织和发育时期的总 RNA，在同样条件下进行反转录。根据已获得的 cDNA 和基因组 DNA 序列，设计跨内含子的基因特异性引物 PSP1 和 PSP2 进行半定量 PCR 扩增，扩增 cDNA 片段为 337 bp，基因组 DNA 片段为 688 bp；同时利用基因特异性引物 NCP1 和 NCP2 对烟夜蛾 18S rRNA 基因(内参)的 cDNA 片段也进行扩增，扩增片段为 170 bp；反应条件为：94℃ 3 min；94℃ 1 min，60℃ 1 min，72℃ 30 s，28 个循环；72℃ 10 min。精确吸取 10 μL PCR产物，在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳，EB 染色，拍照。实验重复 3 次。

1.2.8　序列分析：核苷酸序列分析采用 ChromasPro 软件，氨基酸序列分析采用生物信息学在线工具 http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html，蛋白质二级结构和三级结构预测分别采用在线工具 http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/和 http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=modelling_simple1，同源性比较采用 NCBI 中的 BLAST 工具，序列多重联配采用 EBI 中的 ClustalW 和 Genedoc 软件，进化树构建运用 MAGE4.0 软件中的最大简约法。

2　结果与分析

2.1　烟夜蛾 PBP2 基因 cDNA 和内含子的扩增、克隆及序列测定

以合成的烟夜蛾雄虫触角 cDNA 第一链为模板，利用 PP1 和 PP2 引物进行 PCR 扩增，电泳结果显示有大小约为 450 bp 的目的条带出现(图 1：A)，经过克隆获得了长度为 442 bp 的 DNA 序列。在 NCBI 上经 BLAST 分析，发现此序列与棉铃虫等近缘昆虫的 PBP2 基因的一致性达 91%，证明获得的序列为烟夜蛾 PBP2 基因(命名为 *HassPBP2*)的 cDNA 片段。

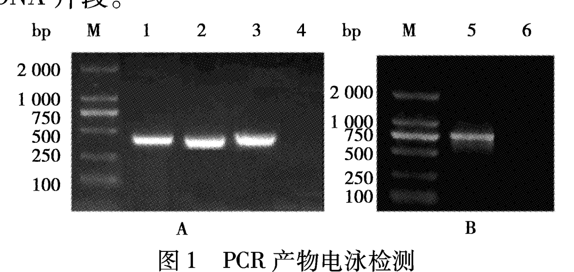


图 1　PCR 产物电泳检测

Fig. 1 PCR amplification of *Helicoverpa assulta* PBP2 gene *HassPBP2*

A：*HassPBP2* cDNA 的克隆 Cloning of *HassPBP2* cDNA；B：*HassPBP2* 基因组 DNA 的克隆 Cloning of *HassPBP2* genomic DNA。M：DNA 分子量标准 DNA marker (DL2000)；1：片断克隆 Cloning of *HassPBP2* fragment；2：3′末端克隆 Cloning of *HassPBP2* 3′ end；3：编码区克隆 Cloning of ORF region；4：阴性对照 Sterile water as template for *HassPBP2*；5：基因组 DNA 克隆 Cloning of genomic DNA；6：阴性对照 Sterile water as template for *HassPBP2*.

根据获得的烟夜蛾 PBP2 基因 *HassPBP2* 的 cDNA 片段信息，设计合成 P3P1 和 P3P2 基因特异性引物并分别与 3′RACE 试剂盒中的 3′RACE Outer Primer 和 3′RACE Inner Primer 引物配对进行套式 PCR 扩增，对 3′RACE 产物进行电泳分析，有大小约为 400 bp 的条带出现（图 1：A），经过克隆和测序获得了 422 bp 的 DNA 序列。将两次获得的 DNA 片段序列进行比对拼接，获得长度为 726 bp 的核苷酸序列（图 2）。序列分析表明，*HassPBP2* 的开放阅读框（ORF）全长 450 bp（图 2）。利用基因特异性引物 POP1 和 POP2 并以烟夜蛾触角 cDNA 第一链为模板扩增 *HassPBP2* 的完整 ORF（图 1：A），经过克隆和测序，获得序列与上述拼接的 ORF 序列完全一致。

```
ATGATGGGCTCAGCGATGTCCTCTAAGGAACTGCTTACAAAGATGAGTGAGGGGTTCACC   60
 M  M  G  S  A  M  S  S  K  E  L  L  T  K  M  S  E  G  F  T    20
                            ><1
AAGGTCGTGGATGCGTGTAAGACTCAGCTTAATGTTGGCGACCACATAACGCAAGACATG   120
 K  V  V  D  A [C] K  T  Q  L  N  V  G  D  H  I  T  Q  D  M    40
TACAACTTCTGGCGCGAGGAGTATCAGCTGGTGAACAGAGACCTGGGCTGCATGATCATG   180
 Y  N  F  W  R  E  E  Y  Q  L  V  N  R  D  L  G [C] M  I  M    60
TGCATGGTAGCCAAGCTCGACCTCATCGGAGACGACCAGAAGATGCACCATGGGAAGGCT   240
[C] M  V  A  K  L  D  L  I  G  D  D  Q  K  M  H  H  G  K  A    80
                              ><2
GAGGAGTTTGCCAAGAGCCACGGTGCTGACGATGTCTTAGCCAAGCAGCTGGTGAGCTTG   300
 E  E  F  A  K  S  H  G  A  D  D  V  L  A  K  Q  L  V  S  L    100
ATCCACAGCTGCGAGACTCAGCACCAAGCTATCGAGGACCACTGCAGCCGGGTCCTGGAG   360
 I  H  S [C] E  T  Q  H  Q  A  I  E  D  H [C] S  R  V  L  E    120
ATAGCCAAGTGCTTCCGCACAAAGATCCACGAGCTCAAGTGGGCGCCCAGCATGGAGGTC   420
 I  A  K [C] F  R  T  K  I  H  E  L  K  W  A  P  S  M  E  V    140
GTCATGGAGGAGATCATGACTGCAGCTTAGatggagaaggagatgaaaataggaatggga   480
 V  M  E  E  I  M  T  A  A  *                                  149
atgtaagaggaagaatggaaagagctaaaagagaagacaagtacttacaataaagtaaga   540
gggaggaataggcaaaaagctttaggtgatcttaaattaaaatgcgttgatataaatttt   600
tgcaatatagattgagatttaataacgtagtagctggaggaagatttggtcatttttt     660
atttagtaggattaatttgttgtcggtactggtgtgtaggtagtttttaaactgaaaaaa   720
aaaaaa                                                         726
Intron 1
gtaaacatctaaactacaccagcccactggtcattcaaaatcaaaccagaattcctaagg   60
tatatgattcctaaatcgtttgttccacag                                 90
Intron 2
gtaggtcgacttgtcaagatttttgataatctaggcttgctgtaatttcctaatggcag    60
ttatttggcaagcaacgcttagttatctttatatggtatcttacaactaagtacgtatgc   120
aagcctggataagaagtcaatttactgcaaagttagctaattaataattacaatcttcgt   180
acactcgtaagtctatattataaagataggtactaaagcatataatagaaattgtaatag   240
ccattaatcttttctccccag                                          261
```

图 2 *HassPBP2* 的 cDNA 序列、推导的氨基酸序列及内含子序列

Fig. 2 Sequences of cDNA, deduced amino acid and intron of *HassPBP2*

___：起始密码子 Start codon was single underlined；*：终止密码子 Stop codon was indicated by asterisk；□：半胱氨酸 Conserved cysteine residues were boxed；___：polyA 加尾信号 Polyadenylation signal domain was double underlined；><：内含子插入位点 Sites of intron were marked with “><”.

此外，以烟夜蛾基因组 DNA 为模板，利用引物 POP1 和 POP2 进行 PCR 扩增，电泳分析结果显示获得大小约为 800 bp 的片段（图 1：B），经过克隆和测序获得长度为 801 bp 的序列。将此序列与 *HassPBP2* 的 cDNA 序列进行比对，发现该序列中包含 2 个内含子，长度分别为 90 和 261 bp（图 2）。

2.2 烟夜蛾 PBP2 基因 cDNA 的序列分析

对 *HassPBP2* 的 cDNA 进行序列分析，结果显示，该基因编码区全长 450 bp，3′端非编码区长 276 bp，编码区推导编码 149 个氨基酸残基（图 3），该基因已在 GenBank 中注册，登录号为 EU316186。利用生物信息学在线工具（http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html）对氨基酸序列进行分析，结果表明，烟夜蛾 PBP2 的预测分子量为 16.9 kD，等电点为 5.56。序列比对结果表明，烟夜蛾 PBP2 与其他昆虫的 PBPs 都含 6 个高度保守的半胱氨酸位点（图 3），并且与它们的一致性在 34% ~91% 之间，其中与棉铃虫 *Helicoverpa armigera* PBP2（HarmPBP2）和烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*（HvirPBP2）的序列一致性最高，达 91%，其次是小地老虎 *Agrotis ipsilon*（AipsPBP2），一致性为 71%；与多音大蚕蛾 *Antheraea polyphemus*（ApolPBP2）和舞毒蛾

Lymantria dispar（LdisPBP2）的一致性较低，分别为 39% 和 34%。系统发育分析结果也表明，昆虫的亲缘关系越近，PBP2 氨基酸序列一致性越高（图 4）。

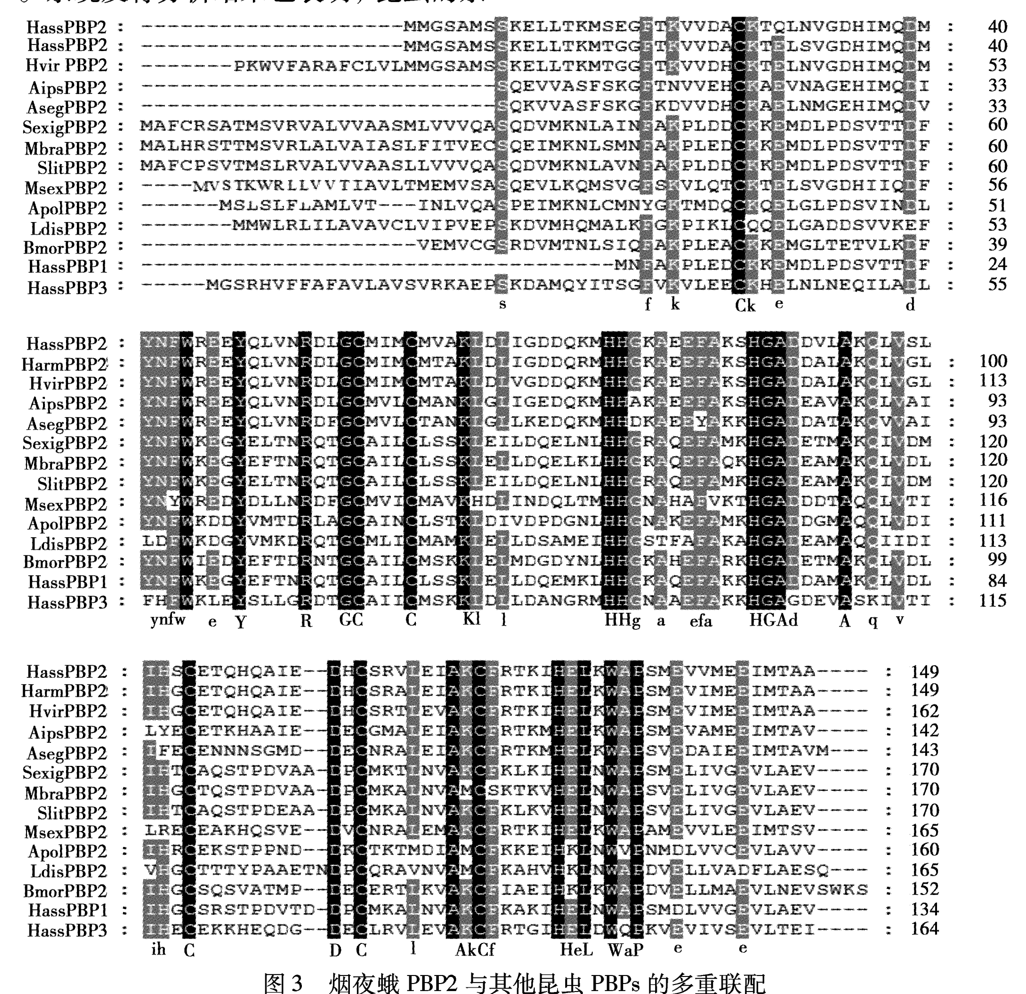


图 3　烟夜蛾 PBP2 与其他昆虫 PBPs 的多重联配

Fig. 3　Amino acid sequence alignment of *Helicoverpa assulta* PBP2 and other insect PBPs

黑色阴影表示氨基酸 100% 一致性，灰色表示 80% 一致性，白色表示 80% 以下一致性。Amino acids with 100% identity are in black box, those with 80% identity are in grey box and those below 80% are in white box. *HassPBP2*：烟夜蛾 *Helicoverpa assulta* PBP2（EU316186）；HarmPBP2：棉铃虫 *Helicoverpa armigera* PBP2（EU647241）；HvirPBP2：烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* PBP2（AM403491）；AipsPBP2：小地老虎 *Agrotis ipsilon* PBP2（AY973627）；AsegPBP2：黄地老虎 *Agrotis segetum* PBP2（AY301987）；SexigPBP2：甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* PBP2（AY545636）；MbraPBP2：甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* PBP2（AF051142）；SlitPBP2：斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* PBP2（DQ114219）；MsexPBP2：烟草天蛾 *Manduca sexta* PBP2（AF117588）；ApolPBP2：多音大蚕蛾 *Antheraea polyphemus* PBP2（AJ277266）；LdisPBP2：舞毒蛾 *Lymantria dispar* PBP2（AF007868）；BmorPBP2：家蚕 *Bombyx mori* PBP2（AM403100）；HassPBP1：烟夜蛾 *Helicoverpa assulta* PBP1（AY864775）；HassPBP3：烟夜蛾 *Helicoverpa assulta* PBP3（DQ286414）. 下同 The same below.

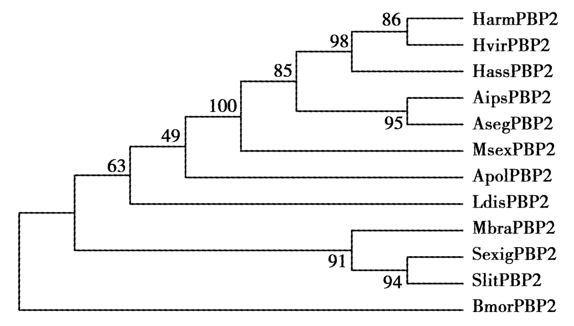


图 4　烟夜蛾与其他昆虫 PBP2 氨基酸的系统发育树

Fig. 4　Phylogenetic tree based on amino acid sequences of PBP2 from *Helicoverpa assulta* and other insects

2.3　烟夜蛾 PBP2 基因的时空表达

利用 PSP1 和 PSP2 跨内含子引物以及半定量 RT-PCR 技术，研究了 *HassPBP2* 在不同组织和发育时期的表达情况。结果表明，*HassPBP2* 在雌、雄虫触角中表达，且在雄虫触角中的表达量大于雌虫，在喙、头、胸、腹、足、翅中不表达（图 5），因此具有触角特异性表达的特征。此外，该基因在卵、幼虫和蛹早期不表达，在蛹中期开始表达，蛹末期到成虫羽化一直保持高水平的表达，而在成虫中期表达量有所下降（图 5）。

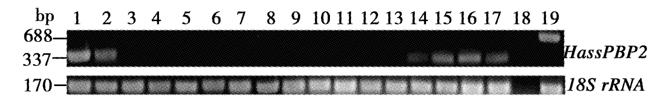


图5 PBP2 基因在烟夜蛾不同组织、不同发育时期的表达

Fig. 5 Temporal and tissue expression of *HassPBP2*

1：雄虫触角 Male antennae；2：雌虫触角 Female antennae；3：喙 Proboscis；4：去除触角和喙的头 Head without antennae and proboscises；5：胸 Thorax；6：腹 Abdomen；7：足 Legs；8：翅 Wings；9：卵 Embryo；10：1 龄幼虫 1st-instar larva；11：3 龄幼虫 3rd-instar larva；12：5 龄幼虫 5th-instar larva；13：1 日龄蛹 1st-day pupa；14：5 日龄蛹 5th-day pupa；15：10 日龄蛹 10th-day pupa；16：1 日龄成虫 1st-day adult；17：5 日龄成虫 5th-day adult；18：空白对照 Sterile water as template for *HassPBP2*；19：基因组 DNA Genomic DNA.

3 讨论

本研究利用 RT-PCR 和 RACE 方法克隆了烟夜蛾 PBP2 基因 *HassPBP2* 序列，并对该基因预测编码的氨基酸序列进行分析，发现其编码的蛋白质分子量约为 16.9 kD，等电点为 5.56，含有 6 个保守的半胱氨酸，具有气味结合蛋白的典型特征。对氨基酸序列一致性分析结果表明，烟夜蛾 PBP2 与 PBP1（吴少英等，2005）、PBP3（刘晓光等，2006）的一致性分别为 50% 和 49%，PBP1 与 PBP3 的一致性为 47%，但烟夜蛾 PBP2 与棉铃虫和烟芽夜蛾 PBP2 的一致性高达 91%。这些结果说明性信息素结合蛋白家族具有多样性，而且同一类型 PBPs 的氨基酸序列更为保守，这可能与不同类型的 PBPs 运输不同的信息素组分有关（修伟明等，2005）。对烟夜蛾 PBP2 和其近缘种、远缘种昆虫 PBP2 的二级和三级结构预测表明，PBP2 主要有 6 个 α-螺旋构成，兼有少量的 β-折叠，存在相似的三级结构，表明昆虫 PBP2 在进化过程中非常保守，可能结合相同或相似的性信息素组分，因此雄虫对雌性信息素的识别很可能还与 PBP2 或者受体蛋白结合信息素的能力有关。

先前的研究认为 PBPs 在雄虫体内特异性表达（Vogt and Riddiford，1981；Laue and Steinbrecht，1997），但是后来发现有些昆虫的 PBPs 不仅在雄虫触角中表达，在雌虫触角中也有表达。如蟑螂 *Leucophaea maderae* 的 PBPs 在识别性信息素的雌虫触角中特异表达（Rivière *et al.*，2003）；斜纹夜蛾的 PBP1 和 PBP2 在雄虫触角中的表达量明显高于雌虫（Xiu *et al.*，2008）；而烟草天蛾雌、雄虫触角中的 PBPs 表达水平基本没有区别（Györgyi *et al.*，1988）。本研究结果显示，烟夜蛾 PBP2 在触角中特异性表达，且在雄虫触角中的表达量大于雌虫。研究发现，烟夜蛾雄虫的寿命为 7～9 d（付晓伟等，2009），交配高峰期在 2～3 日龄。本实验选取初羽化成虫代表未交配状态，5 日龄成虫代表已交配状态，实验结果表明 PBP2 在烟夜蛾羽化初期的表达量明显高于中期的成虫，说明交配后 PBP2 表达量明显降低。至于 PBP2 与求偶和交配的关系，还需要进一步研究。

目前已从 30 多种昆虫触角中克隆出了 50 多种 PBPs 基因的 cDNA 序列，但仅从小地老虎、黄地老虎（Abraham *et al.*，2005）、家蚕（Forstner *et al.*，2006）、甜菜夜蛾（Xiu and Dong，2007）和斜纹夜蛾（Xiu *et al.*，2008）等昆虫中克隆出了 11 条 PBPs 基因的内含子序列。本研究获得的烟夜蛾 PBP2 基因与以上几种昆虫 PBPs 基因的 DNA 结构相比有以下共同特点：（1）3 个外显子被 2 个内含子隔开；（2）具有高度保守的外显子与内含子交界处（intron/exon boundaries）；（3）富含 A-T 碱基。这表明，鳞翅目昆虫 PBPs 的基因源于同一基因家族。但是 PBPs 基因内含子的长度表现出很大的不稳定性，最短的 76 bp，最长的 1 251 bp。由于外显子-内含子交界处核苷酸序列及其数量的稳定性和内含子长度的不稳定性对分析 PBPs 基因的进化和功能具有参考价值，因此还需要发现更多昆虫 PBPs 基因的内含子来提供证据（Xiu and Dong，2007）。

烟夜蛾雌性信息素包括多种组分（Sugie *et al.*，1991），我们已经从烟夜蛾雄虫触角中克隆了 3 种 PBPs 的基因，但是这 3 种基因与烟夜蛾的雌性信息素不同组分的结合关系目前还不清楚，需要做进一步的研究。

参 考 文 献（References）

Abraham D，Löfstedt C，Picimbon JF，2005. Molecular characterization and evolution of pheromone binding protein genes in *Agrotis* moths. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，35（10）：1 100－1 111.

Bette S，Breer H，Krieger J，2002. Probing a pheromone binding protein of the silkmoth *Antheraea polyphemus* by endogenous tryptophan fluorescence. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，32（3）：241－246.

de Santis，Francois MC，Merlin C，Pelletier J，Maïbèche-Coisoné M，Cotie E，Jacquin-Joly E，2006. Molecular cloning and *in situ* expression patterns of two new pheromone-binding proteins from the corn stemborer，*Sesamia nonagrioides*. *J. Chem. Ecol.*，32（8）：1 703－1 717.

Forstner M，Gohl T，Breer H，Krieger J，2006. Candidate pheromone binding proteins of the silkmoth *Bombyx mori*. *Invert. Neurosci.*，8

(4)：177 - 187.

Fu XW, Guo XR, Luo MH, Yuan GH, Hu R, Yang XY, Li L, 2009. Effects of two tobacco species on experimental and natural population dynamics of *Helicoverpa assulta* Guenée. *Acta Ecologica Sinica*, 29 (5)：2 340 - 2 348. [付晓伟, 郭线茹, 罗梅浩, 原国辉, 胡锐, 杨新影, 李亮, 2009. 两种烟草对烟夜蛾实验种群和自然种群增长的影响. 生态学报, 29(5)：2 340 - 2 348]

Györgyi TK, Roby-Shemkovitz AJ, Lemer MR, 1988. Characterization and cDNA cloning of the pheromone-binding protein from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*：a tissue-specific developmentally regulated protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(24)：9 851 - 9 855.

Hansson BS, 1995. Olfaction in Lepidoptera. *Experientia*, 51(11)：1 003 - 1 027.

Krieger J, Gänssle H, Raming K, Breer H, 1993. Odorant binding proteins of *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 23 (4)：449 - 456.

Larsson MC, Domingos AI, Jones WD, Chiappe ME, Amrein H, Vosshall LB, 2004. *Or83b* encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron*, 43(5)：703 - 714.

Laue M, Steinbrecht RA, 1997. Topochemistry of moth olfactory sensilla. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.*, 26(3)：217 - 228.

Liu XG, An SH, Luo MH, Guo XR, Yuan GH, 2006. Cloning and sequencing of cDNA encoding pheromone binding protein 3 from the *Helicoverpa assulta* (Guenée) and its expression in *Escherichia coli*. *Acta Entomologica Sinica*, 49(5)：733 - 739. [刘晓光, 安世恒, 罗梅浩, 郭线茹, 原国辉, 2006. 烟实夜蛾信息素结合蛋白 3 cDNA 的克隆、序列分析与原核表达. 昆虫学报, 49(5)：733 - 739]

Maïbèche-Coisné M, Jacquin-Joly E, Francios MC, Nagnan-Le Meillour P, 1998. Molecular cloning of two pheromone binding proteins in the cabbage armyworm *Mamestra brassicae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28(11)：815 - 818.

Maida R, Krieger J, Gebauer T, Lange U, Ziegelberger G, 2000. Three pheromone-binding proteins in olfactory sensilla of the two silkmoth species *Antheraea polyphemus* and *Antheraea pernyi*. *Eur. J. Biochem.*, 267(10)：2 899 - 2 908.

Nagnan-Le Meillour P, Huet JC, Maibeche M, Pernollet JC, Descoins C, 1996. Purification and characterization of multiple forms of odorant/pheromone binding proteins in the antennae of *Mamestra brassicae* (Noctuidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 26(1)：59 - 67.

Picimbon JF, Gadenne C, 2002. Evolution of noctuid pheromone binding proteins：Identification of PBP in the black cutworm moth, *Agrotis ipsilon*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(8)：839 - 846.

Rivière S, Lartigue A, Quennedey B, Campanacci V, Farine JP, Regoni M, Cambillau C, Brossut R, 2003. A pheromone-binding protein from the cockroach *Leucophaea maderae*：Cloning, expression and pheromone binding. *Biochem. J.*, 371(2)：573 - 579.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 2002. Molecular Cloning：A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sugie H, Tatsuki S, Nakagaki S, Rao CBJ, Yamamoto A, 1991. Identification of the sex pheromone of the oriental tobacco budworm, *Heliothis assulta* (Guenée) (Lepidoptera：Noctuidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 26：(1)：151 - 153.

Vogt RG, Callahan FE, Rogers ME, Dickens JC, 1999. Odorant binding protein diversity and distribution among the insect orders, as indicated by LAP, an OBP-related protein of the true bug *Lygus lineolaris* (Hemiptera, Heteroptera). *Chem. Senses.*, 24(5)：481 - 495.

Vogt RG, Kohne AC, Dubnau JT, Prestwich GD, 1989. Expression of pheromone binding proteins during antennal development in the gypsy moth *Lymantria dispar*. *J. Neurosci.*, 9(9)：3 332 - 3 346.

Vogt RG, Prestwich GD, Lerner MR, 1991. Odorant-binding protein subfamilies associate with distinct classes of olfactory receptor neurons in insects. *J. Neurobiol.*, 22(1)：74 - 84.

Vogt RG, Riddiford LM, 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293(5 828)：161 - 163.

Wang GR, Guo YY, Wu KM, 2002. Progress in the studies of antenna odorant binding proteins of insect. *Acta Entomologica Sinica*, 45 (1)：131 - 137. [王桂荣, 郭予元, 吴孔明, 2002. 昆虫触角气味结合蛋白的研究进展. 昆虫学报, 45(1)：131 - 137]

Wu SY, Wang GR, Wu KM, Guo YY, Yuan GH, Guo XR, 2005. Molecular cloning and sequence analysis of genes encoding GOBP1 and PBP in the antenna of *Helicoverpa assulta* (Guenée). *Scientia Agricultura Sinica*, 38(9)：1 817 - 1 824. [吴少英, 王桂荣, 吴孔明, 郭予元, 原国辉, 郭线茹, 2005. 烟青虫气味结合蛋白基因的克隆与序列分析. 中国农业科学, 38(9)：1 817 - 1 824]

Xiu WM, Dong SL, 2007. Molecular characterization of two pheromone binding proteins and quantitative analysis of their expression in the beet armyworm, *Spodoptera exigua* Hübner. *J. Chem. Ecol.*, 33 (5)：947 - 961.

Xiu WM, Dong SL, Wang YC, 2005. Pheromone binding proteins in insects with emphasis on their molecular transport and physiological functions. *Acta Entomologica Sinica*, 48(5)：778 - 784. [修伟明, 董双林, 王荫长, 2005. 信息素结合蛋白及其分子运输机制和生理功能研究进展. 昆虫学报, 48(5)：778 - 784]

Xiu WM, Zhou YZ, Dong SL, 2008. Molecular characterization and expression pattern of two pheromone-binding proteins from *Spodoptera litura* (Fabricius). *J. Chem. Ecol.*, 34(4)：487 - 498.

Zhou JJ, Robertson G, He X, Dufour S, Hooper AM, Pickett JA, Keep NH, Field LM, 2009. Characterisation of *Bombyx mori* odorant-binding proteins reveals that a general odorant-binding protein discriminates between sex pheromone components. *J. Mol. Biol.*, 389(3)：529 - 545.

(责任编辑：邓艳)